

UPLC-MS/MS를 이용한 경남지역 파프리카 중 neonicotinoid계 농약 잔류 모니터링

김남국* · 이승화 · 남유정 · 문경미 · 박민호 · 윤문희 · 김미영 · 장현민 · 신봉식

국립농산물품질관리원 경남지원 조사분석과

(2011년 1월 18일 접수, 2011년 2월 3일 수리)

Monitoring of Neonicotinoid Pesticide Residues in Paprika Using UPLC-MS/MS from Gyeongnam Region

Nam-Kuk Kim*, Seung Hwa Lee, Yu Jeong Nam, Kyung Mi Moon, Min Ho Park, Mun Hee Yun, Mi Young Kim, Hyun Min Jang and Bong Shig Shin

Gyeongnam Provincial Office, National Agricultural Products Quality Management Service (NAQS), Busan 661-804, Korea

Abstract

Monitoring or follow-up surveying pesticide residues in agricultural commodities is the key to meet the international regulations and to enhance international competitiveness of Korean agricultural commodities. Six neonicotinoid insecticides, acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam were monitored in 95 paprika samples collected from Gyeongnam area. The pesticide residues were extracted by EN15662 buffer based on the QuEChERS method, clean-upped with dispersive solid-phase extraction method to remove interfering pigments, and analyzed using UPLC-MS/MS. The neonicotinoid pesticides were detected in 90.5% of the paprika samples. Two or more pesticides were detected in 82.3% of samples. Although detection frequencies were high, all samples complied with the maximum residue limits (MRLs) set by both the Korea Food and Drug Administration (KFDA) and Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

Key words Neonicotinoid, Pesticide residues, Monitoring, UPLC-MS/MS

서 론

최근 농업에 있어 병해충 및 잡초 방제를 위하여 농약의 사용을 사용하고 있어 농산물 중 잔류농약에 의한 위해 유발 가능성이 제기되고 있다. 따라서 농산물 안전성 확보를 위한 농약의 안전사용 및 관리가 필요하다. Imidacloprid를 포함한 neonicotinoid계 살충제는 다양한 해충방제에 활용되고 있으며(Figure 1), 살충제 시장에 있어 큰 비중을 차지하고 있다(Nauen과 Bretschneider, 2002). 이러한 neonicotinoid

계 살충제는 곤충의 중추신경계(central nervous system)에서 nicotinic acetylcholine receptor(nAChR)의 agonist로 작용하여(Bai 등 1991; Matsuda 등 2001; Zhang 등 2000) 신경전달을 저해함으로써 해충을 치사시키는 것으로 알려져 있다. 또한 침투이행성 농약으로 작물에 잔효성이 있어 농산물에 잔류할 가능성이 있으며(이 등, 2004), 작물의 재배 및 보관 등 다양한 시기에 사용되어 식품을 통해 인간에게 유입 가능한 농약으로 잔류성 모니터링의 중요성이 부각되고 있다.

파프리카는 1994년 국내 재배를 시작으로 1995년 수출용 작물로 재배되기 시작하여 최근 수출이 지속적으로 증가되고 있다. 특히 주 수출 대상국인 일본의 경우 2008년 76%의 일

*연락처 : Tel. +82-51-852-8045, Fax. +82-51-864-7330

E-mail: nkvirus@naqs.go.kr

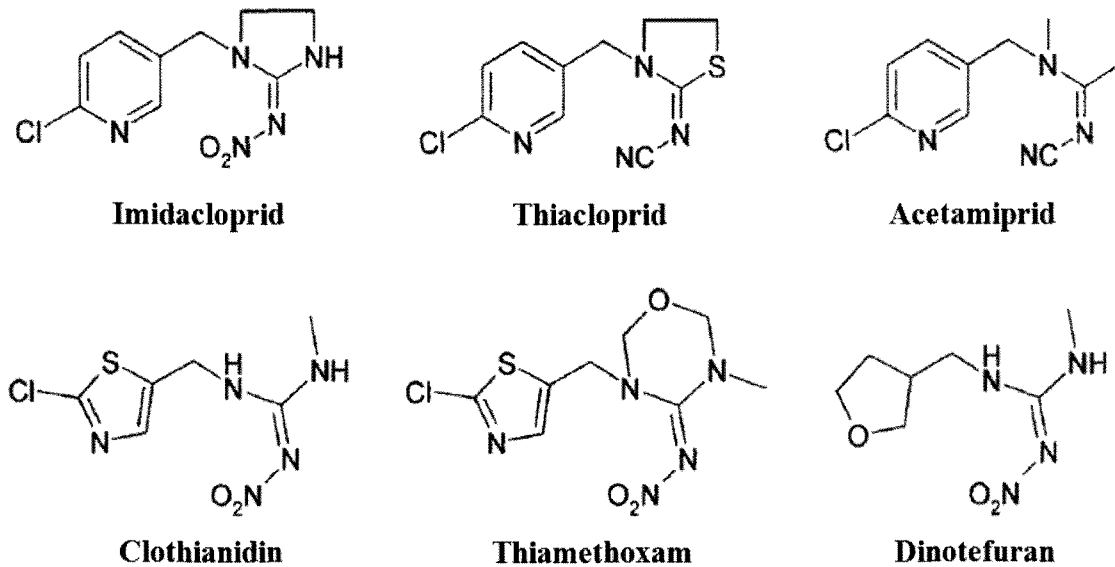


Fig. 1. Chemical structures of six neonicotinoid insecticides used in this experiment.

본시장 점유율을 보였으며, 2009년 수출물량이 17.7천톤으로 53.3천달러의 수입을 창출하였다(농수산물유통공사, 2010). 그러나 2003 및 2006년에 이어 2009년 플로니카미드(flonicamid)의 잔류기준 초과로 인한 수출 감소 및 중단으로 농가수입에 막대한 지장을 초래하여, 수출 농산물에 대한 안전성 관리를 위한 지속적인 모니터링과 효과적인 잔류농약분석법 개발의 필요성이 대두되고 있다.

잔류농약 분석방법은 1960년대 미국 FDA의 Mills 등(1963)에 의해 제안된 분석법을 기초로 하여 추출, 분배 및 정제 방법 등이 지속적으로 개선되고 있다. 현재 gas 및 liquid chromatography에 고전적인 검출기를 대신하여 mass spectrometry(MS)를 사용함으로써 혼합물에서 각각의 물질을 미량의 농도 수준까지 정성 및 정량이 가능해졌으며, 이러한 분석법이 농산물의 잔류농약 분석에 널리 활용되고 있다(옥, 2009). 최근 ultra-performance liquid chromatography(UPLC)의 개발로 분석시간의 단축뿐만 아니라 분리효율(separation efficiency), 해상도(resolution) 및 감도(sensitivity)에 큰 향상을 가져왔다(Swartz, 2005). 현재까지 UPLC 기술을 이용한 잔류농약 분석 연구는 미흡하나, 앞으로 그 활용도가 더 높아질 것으로 판단된다.

본 연구는 UPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS)를 이용하여 6종 농약의 동시 분석이 가능한 MRM(multiple reaction monitoring) 조건을 제시하고, 대일 수출 파프리카에 대한 잔류농약 실태조사를 통한 안전성 평가를 위해 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

2009년 11월부터 2010년 7월까지 경남지역 내 일본 수출용 파프리카 95점을 확보하여 드라이아이스와 함께 마쇄한 후 -20°C 에서 보관하며 분석에 이용하였다. 분석에 사용된 시약으로 acetonitrile(Merck, Germany)은 잔류농약 분석급을 사용하였고, magnesium sulfate(MgSO_4 , Kanto Chemical Co., Inc., Japan), sodium chloride(NaCl , SK Chemicals, Korea), trisodium citrate dihydrate($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany), disodium hydrogencitrate sesquihydrate($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)를 사용하였다. 또한 추출액의 색소 및 불순물 제거를 위하여 graphitized carbon black(GCB)과 primary and secondary exchange material(PSA)이 포함된 dispersive solid-phase extraction(dSPE)법을 활용하였다.

시료의 전처리 및 검량선 작성

파프리카 95점에 대한 neonicotinoid계 잔류농약 분석을 위하여 QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 방법에 기초한 EN 15662 buffer 및 dSPE(Agilent Technologies, USA)법을 활용하여 수행하였다(Lehotay, 2007)(Figure 2). 드라이아이스를 이용하여 곱게 마쇄한 시료 10g을 50 mL tube에 칭량한 후 acetonitrile 10 mL을 첨가하여 시료와 용매가 잘 혼합되도록 1분간 손으로 진탕한 후 시료 내 수분 제거 및 추출을 위한 MgSO_4 , NaCl 등을 포함한 시약들을 첨가하고 얼음을 이용 열을 식히하며 1분간 격렬하

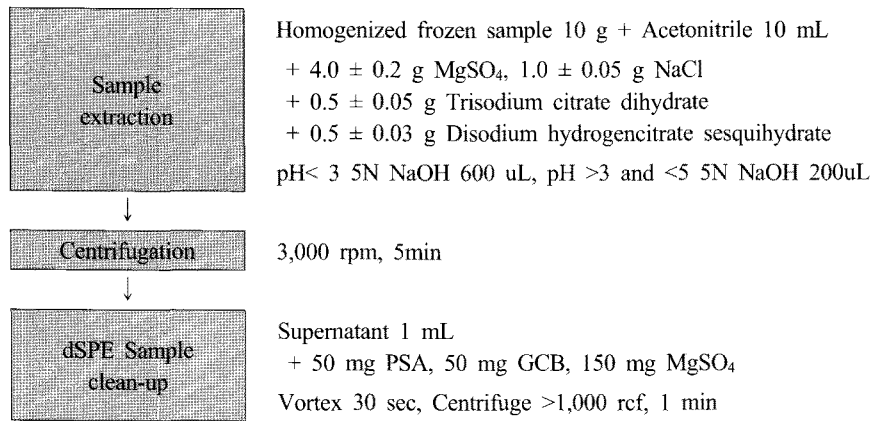


Fig. 2. Flow chart for extraction and clean-up of sample. PSA, primary and secondary exchange material; GCB, graphitized carbon black.

게 진탕하였다. 진탕 후 pH 측정기(pH-200L, Isteck, Korea)를 이용하여 pH를 확인하고, 5N NaOH를 이용 pH가 5~5.5가 되도록 보정하였다. pH가 보정된 시료는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상정액(supernatant) 1 ml을 취해 GCB 및 PSA가 포함된 dSPE법을 활용하여 색소와 불순물을 제거하였다.

잔류농약의 정량분석을 위한 검량선은 각각의 표준품을 acetonitrile에 녹여 500 mg/L의 stock solution을 제조하고

동일용매를 이용하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0 mg/L 농도로 조제한 후, 이들 표준용액을 무처리 시료 추출액과 혼합하여 matrix matched calibration을 작성하였다. 각 농약성분에 대한 회수율 시험은 0.05 및 0.5 mg/kg 수준에서 결과를 확인하였다.

기기분석 조건

추출 및 정제를 통해 얻은 시료의 잔류농약 정량을 위하여

Table 1. UPLC conditions for analysis of pesticides

Time (min)	Flow Rate	Water (+ 0.1%Formic Acid)	Methanol (+ 0.1%Formic Acid)
0.00	0.350	90.0	10.0
0.50	0.350	90.0	10.0
3.75	0.350	10.0	90.0
4.00	0.350	10.0	90.0
4.10	0.350	90.0	10.0
5.00	0.350	90.0	10.0

Table 2. MS/MS conditions for analysis of each pesticide

Pesticide	RT ^{a)}	Monitoring ion (m/z)			Dwell time	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Precursor ion	Qualitative ion	Quantitative ion			
Dinotefuran	2.03	203.29	114.00	129.00	0.050	20	10/10
Thiamethoxam	2.46	292.03	181.00	210.98	0.028	22	24/12
Imidacloprid	2.75	256.16	174.97	209.10	0.028	30	18/14
Clothianidin	2.80	250.10	131.84	168.91	0.025	24	14/14
Acetamiprid	2.94	223.16	98.87	125.85	0.028	32	40/18
Thiacloprid	3.11	253.10	89.97	125.93	0.028	36	38/20

^{a)}Retention time

UPLC-MS/MS(Waters, USA)를, column은 HSS C18 1.8 μ m, 2.1×100 mm(Waters, Ireland)를 사용하였으며 기기분석 조건은 Table 1과 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

분석법의 회수율 및 검출한계

시험농약의 회수율 시험을 위해 10 mg/kg으로 제조한 stock solution을 이용하여 농약 무처리 시료 10 g에 0.05 및 0.5 mg/kg(검출한계의 10배 및 50배)가 되도록 첨가한 후 각각 3반복으로 동일한 전처리 및 분석방법을 통해 분석하였다. 6종의 neonicotinoid계 농약의 회수율은 Table 3과 같이 0.05 및 0.5 mg/kg 수준에서 각각 $84.0 \sim 92.7(\pm 0.0 \sim 3.8\%)$ 과 $95.1 \sim 98.9\%(0.9 \sim 5.2\%)$ 로 나타났다. 각국 또는 국제기구 등에서

연구수행에 활용된 분석방법에 대한 적합성은 회수율과 변이계수 등의 범위를 이용하여 판단하고 있다. 국내의 경우 회수율 70~120% 및 변이계수(coefficient of variation, CV) 20% 이내(농촌진흥청, 2001), EU는 70~110%, 20% 이내로 운영되고 있으며(Philip, 2003), 미국 FDA는 회수율 80~110%로 규정하고 있다(FDA, 1999). 본 연구에 사용된 분석법 또한 회수율 84~98.9% 및 변이계수 0.0~5.2%로 국내 및 국제적 기준에 잘 부합됨을 확인하였다. 또한 이러한 결과는 채소, 과일 및 육류 등을 대상으로 진행된 연구 결과와 유사한 결과로 본 실험에서 수행된 추출, 정제 및 분석법이 neonicotinoid계 농약 분석에 적용 가능함을 확인 할 수 있었다(Obana 등, 2003; Di Muccio 등 2007; Liu 등, 2010). 표준 검량선의 직선성(linearity)은 dinotefuran($r=0.994$) 및 thiamethoxam($r=0.998$)을 제외한 나머지 농약성분에서 0.999

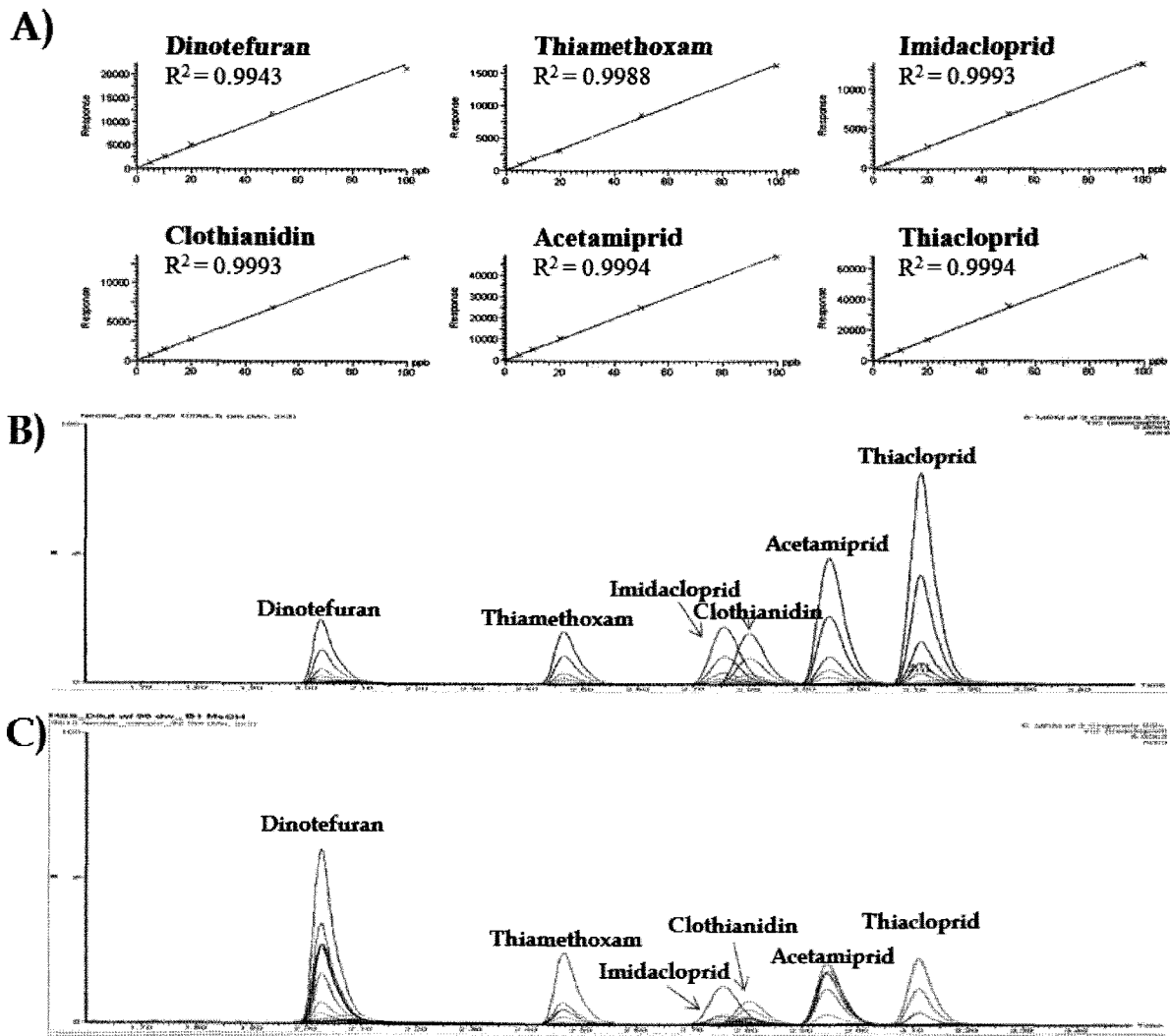


Fig. 3. Results of UPLC-MS/MS analysis. Calibration curves for six pesticides (A) and chromatogram of mixed standards with matrix (B) and samples (C).

Table 3. Recovery from paprika samples spiked with 6 pesticides at 0.05 and 0.50 mg/kg levels

Pesticide	0.05 mg/kg		0.50 mg/kg		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)		
Dinotefuran	90.0	3.8	96.9	0.9	0.003	0.01
Thiamethoxam	84.0	0.0	98.9	4.2	0.003	0.01
Imidacloprid	91.3	2.5	95.1	5.2	0.003	0.01
Clothianidin	91.3	5.5	97.4	2.9	0.003	0.01
Acetamiprid	88.0	2.3	98.9	2.4	0.003	0.01
Thiacloprid	92.7	3.3	97.1	3.3	0.003	0.01

이상의 r값을 얻음으로써 높은 직선성을 보였으며(Figure 3), 검출한계(LOD, limit of detection)와 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 signal-to-noise level의 3배와 10에 해당 되는 값으로 결정하였다(MacDougall과 Crummett, 1980; Jenke, 1996). 각각의 검출한계와 정량한계는 Table 3에 제시하였다.

잔류농약 검출 결과

잔류농약의 모니터링에 있어 국가 잔류허용기준 이상으로 부적합 판정이 나거나 검출 농약이 허용범위 이내라도 정확한 정량을 위해 각 시료가 지닌 매트릭스의 영향을 고려하는 것이 필수적이며, 이는 위해도 평가에도 중요한 자료로 활용 될 것이다. 따라서 본 실험에서는 모든 분석과정에 파프리카의 매트릭스 영향을 고려하여 수행하였다. 경남지역에서 생산되어 일본으로 수출되는 95점의 파프리카 시료로부터 QuEChERS 방법에 기초한 EN15662 buffer 및 dSPE법을 활용하여 추출, 정제 후 UPLC-MS/MS를 이용한 동시다성분 분석을 통하여 neonicotinoid계 농약 6종에 대한 모니터링을 수행하였

으며 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 검출된 농약의 농도는 0.01~1.63 mg/kg으로 확인되었으며, 이중 dinotefuran이 가장 높은 검출 농도를 나타내었다. 그러나 검출된 농약의 잔류수준은 모두 한국 및 일본의 잔류허용기준을 초과하지 않았다(Table 4).

6종의 neonicotinoid계 농약의 검출 빈도 및 현황을 그림 4에 나타내었다. 검출 빈도가 높은 농약으로는 dinotefuran 및 imidacloprid가 시료 중 78.1 및 65.6%로 나타났으며,

Table 4. Summary of pesticide residues monitoring in 95 paprika samples collected from Gyeongnam area

Pesticide	Concentration detected (mg/kg)	MRL (mg/kg)	
		Korea	Japan
Dinotefuran	0.01~1.63	2.0	3
Thiamethoxam	0.01~0.30	1.0	1
Imidacloprid	0.01~0.17	1.0	3
Clothianidin	0.01~0.17	2.0	3
Acetamiprid	0.01~0.36	5.0	5
Thiacloprid	0.01~0.13	1.0	5

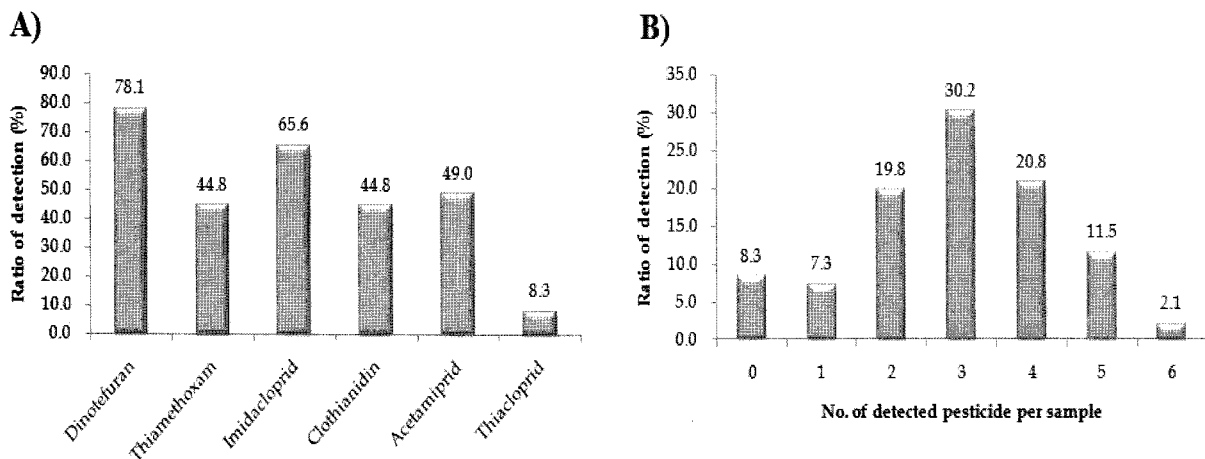


Fig. 4. Pesticides residues detected in paprika. Ratio of each pesticide in all samples (A) and number of detected pesticides in each sample (B).

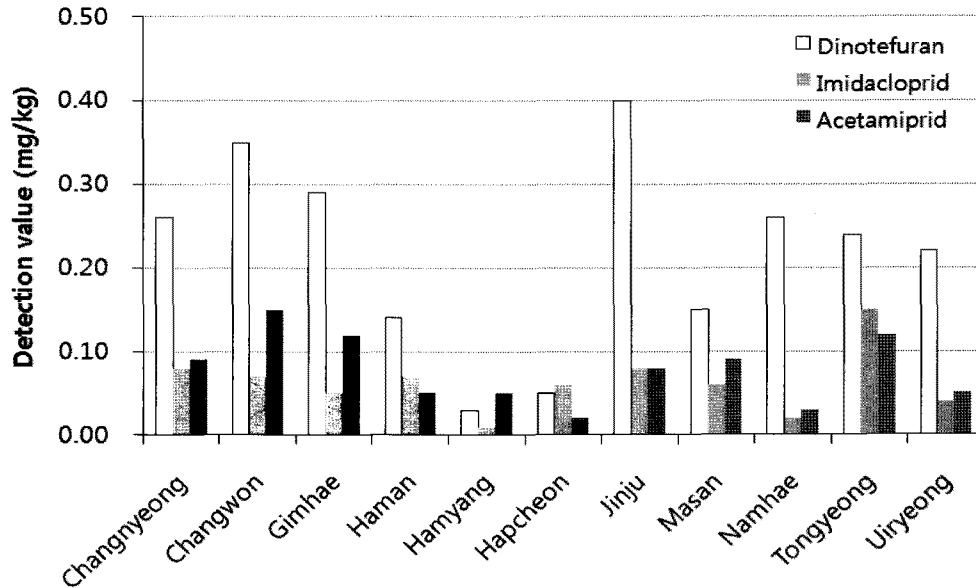


Fig. 5. Regional distribution of three pesticide residues showing higher detection rate in paprika from Gyeongnam province.

thiacloprid는 8.3%로 가장 낮은 빈도를 나타내었다(Figure 4-A). 또한 2종 이상의 농약성분이 검출된 빈도가 82.3%로 대부분 농가에서 2종이상의 농약을 사용하고 있음을 확인하였다(Figure 4-B). 검출빈도가 높은 3종의 농약성분(dinotefuran, imidacloprid 및 acetamiprid)에 대하여 지역별 검출 빈도를 분석한 결과 진주지역에서 dinotefuran 성분이 가장 많이 검출된 것으로 나타났다(Figure 5). 이러한 결과로 볼 때 각 농가에서 해충방제 및 시료 저장성 증대를 위해 2종 이상의 neonicotinoid계 농약을 사용하고 있었으며, dinotefuran이 가장 광범위하게 사용되고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 검출된 6종의 농약성분 모두는 한국 및 일본의 잔류허용기준을 초과하지 않았으며, dinotefuran의 경우를 제외한 나머지 농약의 경우 모두 허용기준에 비해 상당히 낮은 수준임을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 경남지역에서 생산되는 대일 수출 파프리카의 잔류농약이 안전한 수준으로 관리되고 있음을 확인할 수 있었다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Bai, D., Lummis, S., Leicht, W., Breer, H., Sattelle, D. (1991) Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pesticide science* 33(2):197~204.

Di Muccio, A., Fidente, P., Barbini, D., Dommarco, R., Seccia, S., Morrica, P. (2006) Application of solid-phase extraction

and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1108(1):1~6.

FAD (1999) *Pesticide analytical manual*. Vol. I. Section 103: Method application in regulatory analysis (103-1).

Jenke, D. (1996) *Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures*. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 19(5):737~757.

Lehotay, S. J. (2007) Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International* 90(2):485~520.

Liu, S., Zheng, Z., Wei, F., Ren, Y., Gui, W., Wu, H., Zhu, G. (2010) Simultaneous Determination of Seven Neonicotinoid Pesticide Residues in Food by Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6):3271~3278.

MacDougall, D., Crummett, W. (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry* 52(14): 2242~2249.

Matsuda, K., Buckingham, S., Kleier, D., Rauh, J., Grauso, M., Sattelle, D. (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences* 22(11):573~580.

Mills, P.A., Onley, J.H. Gaither, R.A. (1963) Rapid method for chlorinated pesticide residues in non-fatty foods. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 46:186~191.

Nauen, R., Bretschneider, T. (2002) New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook* 13(6):241~245.

Obana, H., Okihashi, M., Akutsu, K., Kitagawa, Y., Hori, S.

- (2003) Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(9):2501~2505.
- Philip, W. L. (2003) Handbook of residue analytical methods for agrochemicals. 1, p. 13~17.
- Swartz, M. (2005) UPLCTM: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28(7): 1253~1263.
- Zhang, A., Kaiser, H., Maienfisch, P., Casida, J. (2000) Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [3H] imidacloprid binding site. *Journal of neurochemistry* 75(3):1294~1303.
- 농수산물유통공사 (2010) 농수산물무역정보:2009년 농림수산물 수출실적.
- 농촌진흥청 (2001) 농약관리법령 고시 예규집. pp. 242~246.
- 육환석 (2009) 잔류농약 분석방법의 개발 동향. *농약과학회지* 13(4): 336~348.
- 이영득, 김찬섭, 임양빈, 오병렬, 이병무, 박병준, 최주현 (2004) Neonicotinoid계 농약의 잔류분석법 개발. *농업과학기술원* pp. 141~163.

UPLC-MS/MS를 이용한 경남지역 파프리카 중 neonicotinoid계 농약 잔류 모니터링

김남국* · 이승화 · 남유정 · 문경미 · 박민호 · 윤문희 · 김미영 · 장현민 · 신봉식

국립농산물품질관리원 경남지원 조사분석과

요 약 본 연구는 QuEChERS 방법에 기초한 EN15662 buffer 및 dSPE, UPLC-MS/MS를 활용하여 경남지역에서 생산되는 대일 수출용 파프리카 내 neonicotinoid계 농약성분의 잔류성 실태 조사를 위하여 수행하였다. 6종의 neonicotinoid계 농약의 회수율 및 변이계수는 0.05 및 0.5 mg/kg 수준에서 각각 84.0~92.7(±0.0~3.8%)과 95.1~98.9%(±0.9~5.2%)로 나타났다. 분석에 사용된 95시료 중 90.3%에서 농약성분이 검출되었으며, 82.3%에서 2종이상의 농약성분이 검출되었다. 검출된 농약의 농도는 0.01~1.63 mg/kg으로 나타났고, 농약성분 중 dinotefuran 및 imidacloprid가 78.1 및 65.6%의 빈도를 보였다. 6종의 농약 중 thiacloprid가 8.3%로 분석된 농약 중 가장 낮은 빈도를 나타내었다. 그러나 검출된 농약의 경우 모두 한국 및 일본의 잔류허용기준을 초과하지 않는 것으로 나타나, 경남지역 생산 대일 수출용 파프리카의 경우 neonicotinoid계 농약에 대한 사용이 안전한 수준으로 잘 관리되고 있음을 확인하였다.

색인어 네오니코티노이드, 잔류농약, 모니터링, UPLC-MS/MS
